

超滤法结合 UPLC 测定抗 601 合剂中黄芩苷、绿原酸在不同血浆中的蛋白结合率

王 绚, 许 静, 张 永*

南京医科大学附属儿童医院, 江苏 南京 210008

摘要: **目的** 超滤法结合超高效液相色谱 (UPLC) 法同时检测抗 601 合剂中 2 种指标性成分——黄芩苷、绿原酸体外血浆蛋白结合率。**方法** 建立 UPLC 法同时测定牛血清白蛋白 (BSA)、大鼠空白血浆和正常人空白血浆超滤液中的黄芩苷、绿原酸含量, 进行专属性、精密度、准确度、稳定性、超滤膜回收率等方法学考察; 配制黄芩苷质量浓度分别为 28.2、141.0、282.0 mg/L, 绿原酸质量浓度为 6.40、32.0、64.0 mg/L 的抗 601 合剂溶液, 分别与 BSA 溶液、大鼠空白血浆、人空白血浆混匀后, 置于 37 °C 水浴温育 4 h, 于超滤离心管中 10 000 r/min 离心 20 min, 取超滤液 10 μ L 注入 UPLC 分析测定, 计算超滤液中黄芩苷和绿原酸浓度及血浆蛋白结合率。**结果** 建立的 UPLC 法专属性、精密度、准确度、稳定性、超滤膜回收率均良好, 能够满足定量分析测试要求; 黄芩苷与 BSA、大鼠空白血浆和正常人空白血浆的蛋白结合率分别为 (73.70 \pm 1.65)%、(82.72 \pm 1.64)%、(87.33 \pm 1.84)%, 绿原酸与 3 种血浆的蛋白结合率分别为 (66.78 \pm 1.91)%、(74.18 \pm 2.01)%、(78.54 \pm 2.97)%, 无浓度相关性, 两成分与 BSA 溶液蛋白结合率显著低于与大鼠空白血浆、人空白血浆结合率 ($P<0.05$)。**结论** 抗 601 合剂中的黄芩苷、绿原酸与不同种属血浆均有较高的蛋白结合率, 在考察范围内无浓度相关性, 归类于中速处置类药物, 体内消除情况与其血浆蛋白结合率可能密切相关。

关键词: 抗 601 合剂; 血浆蛋白结合率; 超滤法; 超高效液相色谱 (UPLC) 法

中图分类号: R962.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2018) 05- 0794 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.05.013

Determination of plasma protein binding rate of baicalin and chlorogenic acid in Anti-601 Mixture by ultrafiltration combined with UPLC

WANG Xuan, XU Jing, ZHANG Yong

Children's Hospital of Nanjing Medical University, Jiangsu Nanjing 210008, China

Abstract: Objective Ultrafiltration combined with ultra high performance liquid chromatography (UPLC) method were established for the simultaneous determination of plasma protein binding rate of two index components baicalin and chlorogenic acid in Anti-601 Mixture. **Methods** The UPLC method was established for the simultaneous determination of baicalin and chlorogenic acid in bovine serum albumin (BSA), blank plasma and normal human blank plasma ultrafiltration, and the methods of specificity, precision, accuracy, stability and ultrafiltration recovery rate were investigated. The Anti-601 Mixture of 3 concentrations was prepared with the concentration of baicalin was 28.2, 141 and 282 mg/L, and the concentration of chlorogenic acid was 6.40, 32.0 and 64.0 mg/L. After mixing the Anti-601 Mixture with BSA solution, rat blank plasma and human blank plasma respectively, the solutions were incubated at 37 C in water bath for 4 h, and placed in the ultrafiltration centrifuge tube for 10000 r/min centrifugation 20 min, and 10 μ L ultrafiltration was injected into UPLC to determine the concentration of baicalin and chlorogenic acid in the ultrafiltration and the binding rate of plasma protein. **Results** The method had high sensitivity, good specificity and reproduction, with simple management in fulfilling the requirements. The plasma protein binding rate of baicalin with BSA, rat plasma and human plasma were (73.70 \pm 1.65)%, (82.72 \pm 1.64)%, (87.33 \pm 1.84)% respectively, and the plasma protein binding rate of chlorogenic acid with BSA, rat plasma and human plasma were (66.78 \pm 1.91)%, (74.18 \pm 2.01)%, (78.54 \pm 2.97)% respectively. No concentration correlation

收稿日期: 2017-09-21

基金项目: 十三五南京市卫生青年人才培养工程第三层次 (QRX17173); 南京药学会—常州四药医院药学科研基金 (2016YX010); 南京医科大学科技发展基金面上项目 (2015NJMU068)

第一作者: 王 绚, 主管药师, 硕士, 从事临床药学工作。Tel: (025)83117533 E-mail: xuan_jeanne@163.com

*通信作者: 张 永, 副主任药师, 硕士, 从事医院药学工作。Tel: (025)83117533 E-mail: fusematic@163.com

was observed. The binding rate of two components to BSA solution protein was significantly lower than that of rat blank plasma and human blank plasma ($P < 0.05$). **Conclusion** The two major compounds in Anti-601 Mixture showed a high binding power to plasma protein of different species *in vitro*, and it was independent of the investigated concentrations. It is classified as medium speed treatment drugs, elimination *in vivo* may be closely related to plasma protein binding rate.

Key words: Anti-601 Mixture; plasma protein binding rate; ultrafiltration; UPLC

抗 601 合剂是经江苏省药品监督管理局批准临床使用的南京市儿童医院经典自制制剂,由金银花、黄芩、大黄、黄柏、板蓝根五味药精制而成,具有清热解毒、抗病毒的功效,既清上焦之火,亦泻下焦之火,临床上可用于病毒性感冒、扁桃腺炎、腮腺炎、急性支气管炎等,为我院的明星产品,深受患儿欢迎。其中,指标性成分之一的黄芩苷具有抗病毒、抗菌、抑制炎症反应、利尿、抗癌等作用^[1];另一指标性成分绿原酸是金银花的主要有效成分,又名咖啡鞣酸,为某些药材和中成药抗菌解毒、消炎利胆的主要药效物质,也是众多中药制剂质量控制的重要指标,被称为国际公认的“植物黄金”^[2]。此外,制剂中还含有小檗碱、大黄酸等有效成分,协同作用共同发挥药效。

药物的血浆蛋白结合率是药动学的重要参数之一,影响药物在体内的分布、代谢、排泄等的速率,从而间接影响药物在体内的作用强度及时间,并且往往与药物的作用机制以及药物的相互作用密切相关,对新药研发及指导临床用药具有重要意义^[3-4]。抗 601 合剂具有较高的临床应用价值,但其主要成分的血浆蛋白结合率研究尚未见报道。本研究采用超滤法模拟抗 601 合剂在机体内以可能的浓度与血浆结合的过程,超高效液相色谱(UPLC)法测定黄芩苷及绿原酸在牛血清白蛋白(BSA)、大鼠血浆和正常人血浆中的蛋白结合率,为后期药物临床评价及应用奠定基础,也为中药制剂的进一步开发提供理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器

UPLC 系统(Waters ACQUITY UPLC system, Waters Empower 2.0 工作站); AG-285 电子天平(瑞典 METTLER 公司); KQ-500E 型(昆山市超声仪器有限公司); TGL-16G 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂); WH-3 微型涡旋混合仪(上海市沪西分析仪器厂有限公司);超滤离心管(截留相对分子质量 1×10^4 , 美国 Millipore 公司)。

1.2 药物及主要试剂

抗 601 合剂(南京市儿童医院制备,批号

160301,绿原酸平均质量浓度为 0.35 mg/mL,黄芩苷平均含量为 1.54 mg/mL^[5]);黄芩苷对照品(批号 110715-201318)、绿原酸对照品(批号 110753-201314),均购自中国食品药品检定研究院;大鼠空白血浆(南京中医药大学实验动物中心);BSA(Sigma 公司);健康人空白血浆(南京市儿童医院);甲醇、甲酸(色谱纯);超纯水;其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[5]

色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 column (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm),流动相 A 为 0.3%甲酸水,流动相 B 为甲醇,按表 1 中程序梯度洗脱,柱温 40 °C;检测波长 280 nm;体积流量 0.3 mL/min;进样量 10 μL。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Flow phase gradient elution program

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~2	85	15
2~7	85→40	15→60
7~10	40→10	60→90
10~12	10	90
12~13	10→85	90→15

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液 精密称取干燥至恒重的黄芩苷、绿原酸对照品适量,甲醇定容制成黄芩苷及绿原酸质量浓度分别为 2.82、0.64 g/L 的混合溶液,备用。

2.2.2 供试品溶液 精密量取抗 601 合剂样品 5 mL 至 100 mL 量瓶中,50%甲醇溶解后超声 30 min,稀释至刻度,摇匀后 10 000 r/min 离心 5 min,取上清液。

2.2.3 BSA 蛋白溶液 以 pH 7.4 的等渗磷酸缓冲液(PBS)溶解,配制成 40 g/L 的 BSA 溶液,置于 4 °C 冰箱冷藏备用。

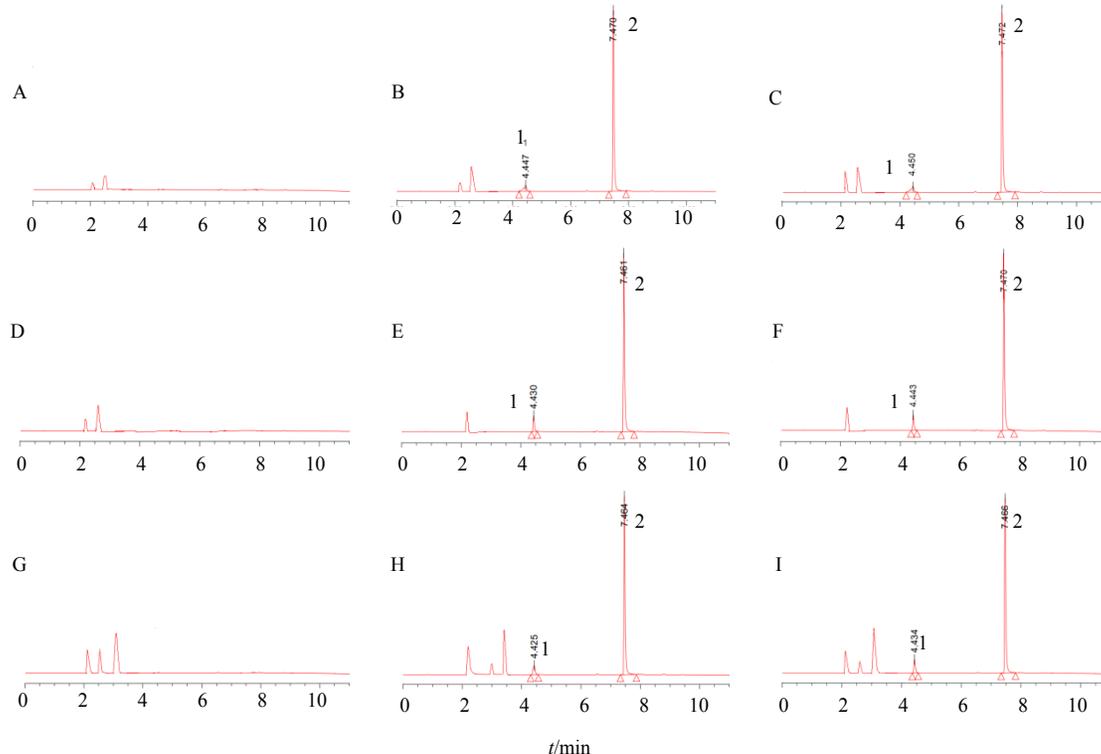
2.3 方法学考察

2.3.1 专属性考察 取 BSA 溶液、大鼠空白血浆、

人空白血浆各 500 μL , 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中温育 4 h 后置于超滤管超滤膜上, 10 000 r/min 离心 20 min, 分别得超滤液; 分别对各超滤液、超滤液+对照品/供试品进样 10 μL 测定分析。在“2.1”项色谱条件下, 黄芩苷、绿原酸分离良好, 无杂质干扰, 具有较高的专属性, 分析条件可行, 色谱图见图 1。

2.3.2 标准曲线的制备 精密吸取黄芩苷、绿原酸对照品溶液适量, PBS 倍比稀释配制黄芩苷系列

质量浓度为 2.82、5.64、14.1、28.2、56.4、282.0、564.0 mg/L, 绿原酸系列浓度为 0.64、1.28、3.2、6.4、12.8、64.0、128.0 mg/L 的混标溶液, 进样 10 μL 。以各成分质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标作线性回归, 黄芩苷、绿原酸标准曲线方程分别为: $Y=29\,912X-2\,187$, $r=0.999\,9$; $Y=12\,157X+1\,998$, $r=0.999\,9$, 表明黄芩苷在 2.82~564.0 mg/L, 绿原酸在 0.64~128.0 mg/L 范围内呈良好的线性关系。



A- BSA 超滤液; B-BSA 超滤液+对照品; C-BSA 超滤液+供试品; D-大鼠空白血浆超滤液; E-大鼠空白血浆超滤液+对照品; F-大鼠空白血浆超滤液+供试品; G-人空白血浆超滤液; H-人空白血浆超滤液+对照品; I-人空白血浆超滤液+供试品; 1-绿原酸; 2-黄芩苷

A- BSA ultrafiltration; B-BSA ultrafiltration + reference; C-BSA ultrafiltration + trial products; D- rat blank plasma ultrafiltration; E- rat blank plasma ultrafiltration + reference; F- rat blank plasma ultrafiltration + trial products; G- human blank plasma ultrafiltration; H- blank plasma ultrafiltration + reference; I- human blank plasma ultrafiltration + trial products; 1 - chlorogenic acid; 2 - baicalin

图 1 各样品 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatography of samples

2.3.3 精密度及准确度试验 取 PBS 配制低、中、高 3 个质量浓度分别为 5.64、56.4、282.0 mg/L 的黄芩苷及 1.28、12.8、64.0 mg/L 的绿原酸质控样品, 1 d 内分别测定 5 次, 连续测定 5 d, 分别考察精密度、准确度。结果显示, 黄芩苷的日内及日间 RSD 分别为 2.89% 和 1.34%, 准确度为 $(102.7 \pm 2.62)\%$ 。绿原酸的日内及日间 RSD 分别为 2.20% 和 3.52%, 准确度为 $(98.53 \pm 2.14)\%$ 。表明方法精密度及准确度良好, 符合生物样本分析方法的要求。

2.3.4 稳定性试验 分别考察质控样品于室温保存 0、4、8、12、24 h 和 -20°C 冷藏保存 0、1、2、4 d 的稳定性, 结果样品 RSD 均 $<8\%$, 表明低、中、高浓度的质控样品在室温 24 h 内和 -20°C 冷藏 4 d 均稳定。

2.3.5 超滤膜回收率考察 取 PBS 配制黄芩苷质量浓度为 5.64、56.4、282.0 mg/L, 绿原酸质量浓度为 1.28、12.8、64.0 mg/L 的低、中、高 3 个浓度的混合溶液各 300 μL 置于超滤管超滤膜上, 10 000 r/min 离心 20 min, 取超滤液各 10 μL 进样测定, 与混合溶

液峰面积对比计算回收率。结果显示,超滤膜的回收率为96.8%~101.9%,表明超滤膜对抗601合剂中的黄芩苷及绿原酸无特异性吸附。

2.4 血浆蛋白结合率实验

经前期UPLC法测定,抗601合剂中绿原酸平均质量浓度为0.35 mg/mL,黄芩苷平均质量浓度为1.54 mg/mL^[5]。精密吸取抗601合剂供试品储备液适量,加pH 7.4磷酸盐缓冲液稀释至刻度,分别得到黄芩苷质量浓度分别为28.2、141.0、282.0 mg/L,绿原酸质量浓度为6.40、32.0、64.0 mg/L的抗601

合剂样品溶液。精密吸取3个浓度的样品溶液30 μL于Eppendorf离心管中,分别加入BSA溶液、大鼠空白血浆、人空白血浆各570 μL(每种浓度平行5份),涡旋混合均匀30 s后,置于37 °C水浴温育4 h,移取500 μL含药血浆于超滤离心管中,离心机中10 000 r/min离心20 min,取超滤液10 μL注入UPLC分析测定,计算超滤液中黄芩苷和绿原酸浓度及血浆蛋白结合率,结果见表1。

血浆蛋白结合率=(血浆药物总浓度 C_t -超滤液中药物浓度 C_f)/血浆药物总浓度 C_t

表1 BSA溶液、大鼠空白血浆、人空白血浆中抗601合剂黄芩苷、绿原酸的血浆蛋白结合率($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Protein binding rates of baicalin and chlorogenic acid of Anti-601 Mixture in BSA, rat plasma and human plasma ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	质量浓度/(mg·L ⁻¹)	血浆蛋白结合率/%		
		BSA溶液	大鼠空白血浆	人空白血浆
黄芩苷	1.41	73.18±2.32	80.34±1.95	87.20±3.01
	7.05	74.53±1.76	84.62±1.45	86.11±1.64
	14.1	73.43±0.48	83.21±1.56	88.69±0.89
	平均	73.70±1.65*	82.72±1.64	87.33±1.84
绿原酸	0.32	68.95±1.07	75.31±2.78	79.43±3.67
	1.60	66.36±1.98	74.87±2.75	77.28±3.07
	3.20	65.04±2.69	72.38±0.51	78.91±2.20
	平均	66.78±1.91*	74.18±2.01	78.54±2.97

与大鼠血浆组、人血浆组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs rat plasma group and human plasma group

数据经SPSS 19.0软件进行方差分析,结果表明,抗601合剂中黄芩苷、绿原酸低、中、高质量浓度的血浆蛋白结合率之间无显著性差异;与BSA溶液、大鼠空白血浆、人空白血浆的蛋白结合率比较为:人>大鼠>BSA,与BSA溶液蛋白结合率显著低于与大鼠空白血浆、人空白血浆结合率,差异显著($P<0.05$)。

3 讨论

血浆蛋白结合率的测定方法有平衡透析法、超滤法、微透析法及高效前沿色谱法等,其中前2种方法较为常用^[6-7]。平衡透析法操作简单,但透析平衡时间较长,可能会引起药物与蛋白的降解,且易受血浆和缓冲液pH、Gibbs-Donnan效应、透析膜非特异性的表面吸附等因素的影响。超滤法简便快速,减少了非特异性设备表面的吸附,缩短了平衡时间,加速了待测样品的溶解时间,离心通常仅需十几分钟至数十分钟,即可收集到足够供测定的血浆超滤液,尤其适合于游离血药浓度的测定^[8]。

本实验采用37 °C为温育温度以模仿人体正常体温并考察温育时间的差异,通过预试验对不同时间点BSA、大鼠和人血浆的取样分析,确定抗601合剂与蛋白温育4 h已达到结合平衡,且血浆或缓冲液中药物在考察时间内稳定性良好。依据超滤液体积与超滤前总体积之比以0.3~0.6为宜(避免蛋白质溶液因超滤而过分浓缩,引起药物与蛋白结合常数变化)及超滤速度不宜过大(一般为3 000~10 000 r/min,过大易导致超滤膜破损、样品泄漏)的标准^[9],最终确定蛋白质溶液经10 000 r/min超滤20 min,即可保证结果的准确性。

药物蛋白结合率为药物临床评价不可缺少的指标。稳定的血浆蛋白结合率,使游离型药物浓度保持相对稳定,有利于药效的持续充分发挥。血浆中与药物相结合的血浆蛋白主要是 α -酸性糖蛋白、脂蛋白和白蛋白,其中白蛋白含量最高(正常值35~55 g/L),且白蛋白主要与有机酸类药物结合^[11]。实验结果表明,在涵盖临床给药质量浓度的范围内,

抗 601 合剂中黄芩苷与 BSA 溶液、大鼠空白血浆、正常人空白血浆的蛋白结合率分别为 (73.70 ± 1.65) %、(82.72 ± 1.64) %、(87.33 ± 1.84) %，绿原酸与 BSA 溶液、大鼠空白血浆、空白人血浆的蛋白结合率分别为 (66.78 ± 1.91) %、(74.18 ± 2.01) %、(78.54 ± 2.97) %，无质量浓度相关性，但不同种属血浆间存在差异，可能与血浆或血清所含蛋白成分组成或含量不同及结合位点不同有关^[10]。本文选取的指标成分均为酚酸类化合物，因结构不同，其蛋白结合率亦有差异。黄芩苷和绿原酸与 BSA、大鼠血浆、正常人血浆结合较紧密，故推测抗 601 合剂归类于中速处置类药物，体内消除情况与其血浆蛋白结合率可能密切相关^[12]。文献研究^[13-15]表明，绿原酸多与血清白蛋白的 Site I 结合，提示抗 601 合剂在临床应用时易受患者病理状态或其他药物合用的影响，应注意配伍用药的安全性，如药物与血浆蛋白结合的竞争性置换作用可能引发的不良反应。

本实验首次采用超滤法结合 UPLC 法测定并比较了抗 601 合剂黄芩苷和绿原酸在不同种属血浆中的蛋白结合率，为后期药效和药代相关性分析奠定基础，也为制剂的进一步开发和临床应用提供理论依据。UPLC 法较 HPLC 法运行时间大大缩短，具有高分离度和高灵敏度，且多组分的血浆蛋白结合率测定更能全面反映药物与血浆蛋白结合的相互作用。本研究有利于预测抗 601 合剂以有效部位或有效提取物形式给药后多成分协同作用的体内过程和作用机制，对临床安全合理用药具有较为重要的指导意义。后期可对血浆种属差异及抗 601 合剂多个成分之间是否存在血浆蛋白结合相互作用等方面进行更深入的探讨。

参考文献

- [1] 中国药典 (一部) [S]. 2015.
- [2] 陈少萍. 绿原酸药代动力学研究进展 [J]. 中成药, 2010, 32(4): 645-648.
- [3] 郭 宾, 李 川. 药物与血浆蛋白结合的药理学基础

及其研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(3): 241-253.

- [4] 关 瑾, 丁 爽, 刘芷含. 药物-血浆蛋白结合率测定方法的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(10): 1149-1153.
- [5] 王 绚, 程莉华, 徐 进, 等. UPLC 法测定抗 601 合剂中黄芩苷、绿原酸的含量 [J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(4): 370-372.
- [6] Beier H, Kaiser K, Langhans M, et al. Peritoneal microdialysis in freely moving rodents: an alternative to blood sampling for pharmacokinetic studies in the rat and the mouse [J]. Eur J Pharm Sci, 2007, 30(1): 75-83.
- [7] Karla L S, Dennis O S, Craig E L, et al. Pharmacokinetic studies of aspirin in rats using in vivo microdialysis sampling [J]. Anal Chem Acta, 2008, 246(1): 1811.
- [8] 吴 阳, 张英丰. 超滤法测定脱水穿心莲内酯的血浆蛋白结合率 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 57-59.
- [9] 陈 豆, 涂 星, 张英丰. 超滤法测定丹酚酸 A 的血浆蛋白结合率 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 77-80.
- [10] 叶 勇, 黄秋洁, 刘华钢. 超滤法测定脱氢卡维丁的血浆蛋白结合率 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(1): 12-15.
- [11] 吴 磊, 陆 超, 戴国梁, 等. 清热养心颗粒中绿原酸在不同血浆中的蛋白结合率测定 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(9): 1331-1332.
- [12] 李晓天, 褚延乐, 吴凤娟, 等. 超滤法测定冬凌草乙素的血浆蛋白结合率 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(20): 2418-2422.
- [13] 周 玲, 居文政, 刘子修, 等. 灯盏细辛注射液多成分血浆蛋白结合率测定 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(5): 719-722.
- [14] 童成亮, 吴小英. 牡荆素血浆蛋白结合率的测定 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(14): 2168-2170.
- [15] Kang J, Liu Y, Xie M X, et al. Interactions of human serum albumin with chlorogenic acid and ferulic acid [J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1674(2): 205-214.